

# Bilan d'activité scientifique et technique de 2002 – 2004

## **Nombre de souches expertisées entre 2002 et 2004.**

- En 2004, 126 laboratoires Français de 104 villes différentes et de 25 laboratoires étrangers de (21 pays européens et 5 du reste du monde) nous ont envoyé une ou plusieurs souches ou prélèvements pour identification, recherche de lien épidémiologique ou détection de production de toxine.
- Entre 2002 et 2004, le CNR a reçu 2874 (832 en 2002, 813 en 2003, 1229 en 2004) souches de staphylocoques dont 2193 souches de *S. aureus* (502 en 2002, 702 en 2003, 989 en 2004). Les demandes étaient :
  - pour 2196 souches une recherche de toxines (716 en 2002, 559 en 2003, 921 en 2004),
  - pour 299 souches une recherche de lien de clonalité (81 en 2002, 105 en 2003, 113 en 2004) dans le cadre de 48 épidémies (14 en 2002, 17 en 2003, 17 2004)
  - pour 246 souches (35 en 2002, 77 en 2003, 134 en 2004) une demande d'identification.
  - Enquête ONERBA 2004 : "SARM producteur de la leucocidine de Panton Valentine". Il s'agit de 78 souches reçues au CNR dont 71 SARM (54 PVL +) et 7 SASM (1 PVL +).
- Il faut noter la constante augmentation du nombre de demande d'expertise pour l'étranger (en 2003, 174 souches pour l'Europe et 29 pour le reste du monde et pour l'année 2004, 84 souches pour l'Europe et 52 pour le reste du monde).
- Pour la recherche de résistance aux antibiotiques entre 2002 et 2004 : 1039 souches de staphylocoques provenant de laboratoires extérieurs aux hôpitaux de Lyon ont été analysées.

## **Nombre de souches adressées à des laboratoires français et étrangers entre 2002 et 2004.**

Le CNR a également adressé 159 souches de la collection du CNR en France (26 en 2002, 116 en 2003, 17 en 2004) et 740 souches à l'étranger (64 en 2002, 228 en 2003, 448 en 2004) ainsi que 115 ADN de staphylocoques à l'étranger. A l'étranger, les correspondants sont en Allemagne, Australie, Belgique, Chine, Espagne, Finlande, Grèce, Hollande, Irlande, Italie, Japon,

Norvège, Pays Bas, Pologne, Portugal, Royaume Uni, Singapour, Slovénie, Suède, Suisse, Tchéquie, Turquie, USA.

Par ailleurs, le CNR a déposé 70 souches auprès d'une collection internationale de staphylocoques dorés.

### **III - Bilan qualitatif et quantitatif sur des syndromes toxiques à *S. aureus* en France entre 2002 et 2004.**

Le CNR a réalisé la détermination du profil toxinique par PCR à partir de 2006 souches ou produits pathologiques humains (519 en 2002, 566 en 2003, 921 en 2004). Après une stagnation du nombre total de **cas de syndromes toxiques** déclarés en 2001 (équivalent à celui de 1999 et à 1998), le nombre de cas déclarés en France a de nouveau augmenté pour atteindre 108 cas en 2002, 114 en 2003 mais 75 en 2004 (Tableau 1). Cette augmentation concerne en particulier le choc toxique staphylococcique et les syndromes d'exfoliations généralisés staphylococciques. Cette observation ne traduit sans doute pas une augmentation de l'incidence de ces maladies en France, mais une sensibilisation des cliniciens et microbiologistes suite à une plus large diffusion de l'information depuis plusieurs années.

**Tableau 1.** Nombre de cas de toxémies staphylococciques humaines recensées par le CNR des Staphylocoques de Lyon entre 1994 et 2004 en France.

Année	Syndrome d'exfoliation généralisée	Impétigo bulleux	Choc toxique staphylococcique	Scarlatine staphylococcique	Total Syndromes/an
1994	6	5	7	7	25
1995	4	8	14	10	36
1996	6	7	7	12	32
1997	6	7	11	11	35
1998	19	10	20	17	66
1999	20	14	29	15	78
2000	12	23	43	19	97
2001	12	16	25	16	69
2002	25	19	35	29	108
2003	27	18	48	21	114
2004	22	8	32	13	75
Total	159	135	271	170	735

### **Méthodologie d'expertise des souches et produit biologiques :**

Par l'extension de l'utilisation de la PCR multiplex sont recherchés les gènes suivants : ceux codant la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST), les entérotoxines de A à P (SEA à SEP), les exfoliatines A, B, D et deux nouvelles exfoliatines en cours de description V1 et V2, les toxines synergohyménotropes (comme les gamma-toxines 1 et 2, la leucocidine lukD-LukE, LukM, la leucocidine de Panton Valentine), l'EDIN A à C, et l'hémolysine bêta. De plus, nous avons inclus la recherche du gène *mecA* codant la résistance à la pénicilline et le polymorphisme du gène *agr* qui est un bon indicateur du fond génétique de la souche.

Par ailleurs, la recherche d'entérotoxines A-E dans les produits biologiques par une méthode immuno-enzymatique a été adjointe à la recherche de TSST-1.

L'étude des corrélations clinico-biologiques entre le profil toxinique et la présentation clinique a permis de dégager des informations importantes pour les différents syndromes toxiniques :

#### Chocs toxiques staphylococciques (TSS) et formes incomplètes.

- 115 cas de TSS ont été rapportés (35 en 2002, 48 en 2003, 32 en 2004), dont 11 cas de TSS menstruel.

Dans les 104 autres cas, les chocs sont survenus dans les suites de suppurations à *S. aureus*, soit lors d'infections nosocomiales, soit d'infections communautaires. Les souches étaient le plus souvent sensibles à la méticilline mais on a observé depuis 2002, l'émergence et la diffusion d'un clone contenant le gène de résistance à la méticilline et celui du choc toxique staphylococcique.

- 63 cas de scarlatine staphylococcique (SS) ont été rapportés (29 en 2002, 21 en 2003 et 13 en 2004). Il s'agit parfois d'infections survenant après pharyngites (4 en 2002, 2 en 2003, 3 en 2004). Les autres cas sont survenus à la suite d'infections suppuratives communautaires ou nosocomiales. De nouveau, on a vu apparaître l'émergence et la diffusion d'un clone communautaire contenant le gène *mecA* codant la résistance à la méticilline, la toxine du choc staphylococcique et responsable de scarlatine staphylococcique.

#### Intoxications alimentaires individuelles et collectives.

Le CNR a été contacté pour expertise lors de 11 cas d'intoxications alimentaires collectives (4 en 2002, 5 en 2003, 2 en 2004).

En 2002, dans un premier cas (Rhône), l'entérotoxine A a été détectée dans l'aliment incriminé (choux à la crème). Dans le second cas, l'entérotoxine B a été détectée dans le vomi de deux patients (domiciliés en Côte d'Or). Dans un troisième cas (Ille et Vilaine), nous n'avons eu comme prélèvement qu'un écouvillonnage nasal du cuisinier qui s'est révélé porteur d'une souche de *S. aureus* productrice d'entérotoxines D, G, I, J, M, N et O. Dans le dernier cas, nous n'avons pas mis en évidence d'entérotoxine A à E, mais nous n'avons reçu qu'un prélèvement (un vomi) qui datait de plus d'un mois.

En 2003, dans trois cas (cas 1, 2 et 3), seules les coprocultures étaient disponibles et nous n'avons pas pu préjuger du rôle des souches expertisées dans la survenue de l'intoxication collective. Dans le cas de

TIAC de Sens (cas n°4), 5 vomis sont arrivés pour analyse. Nous n'avons pas détecté d'entérotoxine A à E dans ces prélèvements. Enfin dans le cas d'intoxication par la tomme de Savoie (cas n°5), nous avons expertisé 17 souches provenant de l'aliment incriminé et de témoins. Onze souches de *S. aureus* ont été isolées ; elles possédaient les gènes codant les entérotoxines G, I, M, N et O. Par ailleurs six souches de *S. non-aureus* ont été isolées (*S. saprophyticus*, *S. lentus* et *S. sciuri*). Aucune des souches de *S. aureus* et non-*aureus* ne produisait les entérotoxines A à E classiquement impliquées dans la survenue de TIAC staphylococcique. Concernant les entérotoxines G, I, M, N et O dont nous avons détecté les gènes dans les souches de *S. aureus*, nous n'avons pas encore de méthode fiable permettant de détecter la présence de ces toxines dans les produits biologiques.

En 2004, dans un premier cas nous avons reçu un vomi et une souche de *S. aureus* isolée du vomi. Cette souche possédait les gènes codant les entérotoxines M et O, la présence de ces deux gènes signant habituellement aussi la présence des gènes codant les entérotoxines G, I et N (ces gènes étant situés sur le même élément génétique le locus *egc*). Le second cas concerne une TIAC dans un hôpital de Nice où un patient est décédé dans un contexte de syndrome digestif grave. Les entérotoxines A et C de *S. aureus* ont été mis en évidence dans un aliment par un laboratoire vétérinaire. Nous avons reçu dans le cadre de cette TIAC une souche isolée de la coproculture de ce patient qui ne possédait aucun des gènes codant les entérotoxines. Nous avons aussi analysé 6 souches isolées de prélèvement nasal dans le personnel hospitalier travaillant dans les cuisines. Ces souches possédaient des gènes codant les entérotoxines mais toutes ces souches présentaient des profils toxiques différents démontrant l'absence de lien épidémiologique entre ces souches.

#### Entérocolites à *S. aureus*.

Huit (2 en 2002, 3 en 2003, 3 en 2004) cas d'entérocolites staphylococciques ont été signalés au CNR dont 4 (1 en 2002, 3 en 2003) avec des souches résistantes à la méticilline.

#### Poussées évolutives de maladies auto-immunes entre 2002 et 2003.

Pour 21 cas de vascularite dont 9 maladies de Kawasaki et 11 maladies de Wegener, la production de toxines à activité superantigéniques (entérotoxines et TSST-1) a été recherchée parmi les souches de *S. aureus* colonisant ou infectant les patients. En effet, une telle production est suspectée comme agent responsable de poussée évolutive de ces maladies.

#### Syndromes d'exfoliation staphylococcique.

Le CNR a analysé les souches provenant de 119 cas de syndrome d'exfoliation staphylococcique. Ces cas se répartissent en 74 (25 en 2002, 27 en 2003, 22 en 2004) cas d'exfoliation généralisée et 45 (19 en 2002, 18 en 2003, 8 en 2004) cas d'impétigo bulleux.

Aucune épidémie survenant dans une maternité n'a été déclarée cette année.

La production d'exfoliatine A et/ou B a été détectée dans la majorité des cas ; aucune souche ne produisait les nouvelles exfoliatines (ETV1 et ETV2 en cours de description).

#### Furonculoses et relation avec la diffusion de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline.

169 (66 en 2002, 55 en 2003, 48 en 2004) cas de furonculose chronique, ou de cellulites extensives ont été rapportés au CNR.

Quinze de ces cas étaient reliés à l'épidémie de Lannion. Tous les autres cas étaient communautaires et se répartissent en deux épidémies intra-familiales et des cas sporadiques. Sur les 169 cas, 136 souches étaient productrices de leucocidine de Panton Valentine (53 en 2002, 49 en 2003, 34 en 2004) (PVL), dont 68 (34 en 2002, 20 en 2003, 14 en 2004) résistantes à la méticilline. L'analyse du profil toxinique et du profil de restriction de l'ADN chromosomique de ces souches résistantes à la méticilline montre qu'il s'agissait avant tout du clone européen décrit par le CNR (*agr3*, PVL+ *mecA*+). D'autres

souches correspondaient à l'un des clones de « CA-MRSA » décrits aux Etats-Unis et possède le profil (*agr1*, PVL+, *mecA*+) ou à un nouveau clone (*agr2*, PVL+, *mecA*).

Nous avons pu mettre en évidence la diffusion en France et en Suisse de ces 3 clones de *S. aureus* résistant à la méticilline, producteur de PVL et responsable d'infections communautaires suppuratives.

#### Pneumonies staphylococciques nécrosantes.

52 nouveaux cas de pneumonie nécrosante PVL+ dont 7 cas dus à des souches résistantes à la méticilline, ont été diagnostiqués : (23 en 2002, 18 en 2003, 11 en 2004), 7 souches étaient résistantes à la méticilline (2 en 2002, 2 en 2003, 3 en 2004).

#### IV - Bilan qualitatif et quantitatif sur les recherches de résistance aux antibiotiques.

**Tableau 2 – Répartition des activités du CNR des Staphylocoques pour la résistance de la détection des antibiotiques.**

		2002	2003	2004	Total
	<b>TOTAL</b>	<b>87 souches</b>	<b>129 souches</b>	<b>107 souches</b>	<b>323 souches</b>
	S.aureus		82	117	93
	SCN		5	12	14
<b>PCR pour la détection du gène <i>mecA</i></b>	<b>TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>58</b>	<b>77</b>	<b>183</b>
	positive		22	12	28
	negative		26	46	49
<b>Détection de la souche GISA</b>	<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>78</b>	<b>39</b>	<b>156</b>
	positive		22	28	26
	negative		17	38	13
	douteux				
	inductible			12	12
Antibiogrammes			7		7
CMI		32	4	7	43
Evaluation galerie API Vanco teico		320			320
		220			220
Evaluation ORSA					prélèvements
Gènes macrolides		19	17		36
CMI souches PVL+ et -		96			96
Evaluation milieu SA ID			500		500
			prélèvements		prélèvements
Evaluation milieu MRSAID				278	278
CMI souches				prelevements	prélèvements
CCLIN				328	328
CMI souches LABILLE				362	362
GISA RAISIN				26	26
<b>PCR pour la détection du gène <i>mecA</i> à l'Hôpital E. Herriot</b>	<b>TOTAL</b>	<b>62</b>	<b>68</b>	<b>37</b>	<b>167</b>
	positive		38	36	12
	negative		24	32	25
<b>Détection de la souche GISA à l'Hôpital E. Herriot</b>	<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>43</b>
	positive		17	12	11
	negative		1	1	1
screening					
SARM		350	414	192 de janvier à mai	956
		14 positif	11 positifs	9 positifs	34 positives

**1039 souches ont été reçues au CNR comprenant (tableau 2) :**



- 323 souches ont été envoyées de laboratoires extérieurs pour expertise. Il s'agit de 292 souches de *S. aureus* et de 31 souches de staphylocoques coagulase négative. La provenance des souches est indiquée dans le tableau 3.

-716 ont été reçues dans le cadre de collections pour études de la résistance aux antibiotiques.

**A) Le gène de résistance à la méticilline** a été recherché par PCR pour **183** des souches extérieures aux hôpitaux de Lyon.

Un résultat a été rendu positif dans **62** cas. Il s'agissait de souches exprimant de façon très hétérogène la résistance à l'oxacilline ou présentant un phénotype de résistance associé incomplet.

Un résultat négatif a été rendu dans **121** cas. Il s'agissait :

- de 12 souches sensibles à tous les antibiotiques avec une demande de vérification conformément aux recommandations du CA-SFM (diamètre de la céfoxitine compris entre 24 et 26 mm),
- de 3 hyperproducteurs de bêta-lactamases,
- de 42 souches multirésistantes aux antibiotiques,
- de 55 souches résistantes isolément à l'oxacilline ou aux aminosides, fluoroquinolones ou macrolides. Ces profils de résistance inhabituels faisaient demander une confirmation de l'absence de gène de résistance à la méticilline.

Pour notre centre à l'Hôpital E. Herriot, 167 demandes de recherche du gène *mecA* de résistance à la méticilline ont été faites pour des phénotypes associés inhabituels : 86 se sont avérées positives et 81 négatives.

**B) Détection de souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides :**

L'étude a été demandée pour 156 souches de laboratoires extérieurs, qui avaient pour la plupart un criblage positif, 43 souches de notre centre, et 26 souches de l'étude de la prévalence des "GISA2003" par le réseau BMR-Raisin dont une grande partie a été reçue au CNR en 2004.

Pour chaque souche ont été réalisés par des techniques complémentaires :

- un criblage avec des bandelettes E-Test (vancomycine et teicoplanine) et un inoculum lourd,
- une analyse de population sur gélose cœur-cerveille contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine,
- une analyse de population sur gélose cœur-cerveille contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine, après induction par 2 mg/L de vancomycine,
- une analyse de population en cascade sur gélose cœur-cerveille contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.

**Pour les laboratoires extérieurs**, 76 souches/156 ont été confirmées de sensibilité diminuée aux glycopeptides, il s'agissait principalement de souches hétérogènes, inductibles en présence de glycopeptides (souches hGISA). Quarante des 43 souches de notre centre ont été confirmées positives.

**Concernant l'étude GISA 2003 du réseau RAISIN BMR**, sur les 26 souches reçues, seulement 4 souches ont été confirmées GISA. Elles avaient

été envoyées par le laboratoire dès la fin de l'étude (donc en 2003). Une différence mineure a été observée pour 13 souches ; ces souches GISA inhibées, in vitro, par 8 mg/L de glycopeptides dans les laboratoires étaient qualifiées de souches hétéro-VISA par le CNR. En l'absence d'induction pendant 6 mois, elles étaient devenues sensibles aux glycopeptides (CMI de la vancomycine < ou = 4 mg/L), mais leurs cultures comportaient des populations bactériennes plus résistantes (CMI vancomycine = 5-7 mg/L). Une différence majeure était notée pour 6 souches considérées comme sensibles aux glycopeptides par le CNR, lorsque le délai d'envoi excédait 9 mois. Ces résultats confirment l'instabilité de la détection de la résistance diminuée aux glycopeptiques.

Un criblage pour détection de sensibilité diminuée aux glycopeptides a également été effectuée sur **956** SARM de notre centre de janvier 2002 à mai 2004. La détection a été réalisée sur gélose cœur-cervelle contenant 4 mg/L de vancomycine. Un criblage positif a été obtenu pour 335 souches pour lesquelles les déterminations suivantes ont été réalisées :

- CMI avec une bandelette Etest et un inoculum lourd,
- analyse de population sur gélose cœur-cervelle contenant 4, 6 et 8 mg/L de vancomycine.

Au total **34** souches se sont révélées comme ayant une résistance intermédiaire hétérogène aux glycopeptides (souches dites hGISA), soit 3.6 % des souches étudiées.

### **C) Etudes de CMI**

Quarante trois souches ont été envoyées de laboratoires extérieurs pour études de CMI du linézolide, du synergid ou des glycopeptides.

Le profil de résistance des souches de *S. aureus*, résistantes à la méticilline et responsables d'infections communautaires, a été déterminé pour 93 souches dont 85 PVL + et 7 PVL négative vis-à-vis de 21 antibiotiques.

### **D) Collections de souches pour connaître l'épidémiologie de la résistance associés aux SARM.**

Le CNR a récolté 2 populations de SARM au cours du dernier trimestre 2003. Les résultats préliminaires ont permis de reconnaître le clone majoritaire de SARM diffusant actuellement en France et responsable d'infections nosocomiales. Ce clone peut être retrouvé en communauté et infectant notamment des patients ayant des antécédents d'hospitalisation. Ce clone de SARM se caractérise par sa sensibilité à la méticilline, un allèle agr de type 1, une cassette *SSCmec* de type IV et la présence du gène de l'entérotoxine A. Ce clone nosocomial s'oppose totalement aux véritables clones communautaires de SARM responsables d'infections chez les enfants et les jeunes adultes.

Les deux collections réalisées concernent :

**1) 328 souches de SARM en provenance de 44 laboratoires du réseau CCLIN Sud Est** (ville et hôpitaux), à raison d'un maximum de 10 souches par centre à l'Hôpital E. Herriot, et d'une souche par patient. Pour chaque souche ont été réalisées :

- l'étude des CMI de 18 antibiotiques,
  - la détection du gène *mecA* de résistance à l'oxacilline en cas de doute sur les CMI de l'oxacilline et de la cefoxitine,
  - la détection de la sensibilité diminuée aux glycopeptides.
- L'analyse des données est en cours de réalisation.

**2) 362 souches de SARM en provenance de laboratoires de ville du réseau LABVILLE**, souches consécutives récoltées au cours du dernier trimestre 2003.

Pour chaque souche ont été réalisées

- la vérification de l'identification
- la détection du gène *mecA* de résistance à l'oxacilline par PCR
- l'étude des CMI de 18 antibiotiques
- la détection de la sensibilité diminuée aux glycopeptides.
- la détermination du type *agr*
- la détection des toxines : il s'agit de la détection de la toxine du choc toxique staphylococcique de l'exfoliatine A et B, de la leucocidine de Panton Valentine et de l'entérotoxine A.

L'analyse des données est en cours de réalisation.

## **E) Divers**

Par ailleurs le CNR est en mesure d'effectuer la détection des **cassettes SCCmec** pour les SARM, et **du gène van** de la résistance aux glycopeptides . Les **gènes de résistance aux macrolides** ont été recherchés pour **36** souches de staphylocoques.

## **D) Evaluation de milieux de culture ou de galeries antibiogrammes**

1) le CNR a évalué en 2002 un nouveau **milieu de culture chromogène, l'ORSA**, pour la détection rapide des SARM à partir de prélèvements clinique. L'étude a été réalisée à partir de 220 écouvillons de nez. Vingt deux prélèvements étaient positifs avec SARM.

2) En 2002, Le CNR a effectué l'évaluation d'une galerie API bioMérieux contenant de la vancomycine et de la teicoplanine pour le criblage des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides. L'étude a été effectuée sur 320 souches.

3) En 2003, à la demande des laboratoires bioMérieux, le CNR a **évalué un nouveau milieu de culture chromogène, le SAID**, pour la détection rapide de ***S. aureus*** à partir de prélèvements cliniques. L'étude a été réalisée à partir de 500 prélèvements d'origines variées.

4) En 2004, à la demande des laboratoires bioMérieux, le CNR a **évalué un nouveau milieu de culture chromogène, le MRSA ID**, pour la détection

rapide des SARM à partir de prélèvements cliniques. L'étude a été réalisée à partir de 278 écouvillons de nez. Quarante cinq prélèvements étaient positifs avec SARM.

**Tableau 3 – Origine géographique des souches de staphylocoques adressées au CNR.**

<b>2002</b>		<b>2003</b>		<b>2004</b>	
Provenance	nb	Provenance	nb	Provenance	nb
Aire sur Adour	1	Angers	1	Angouleme	1
Angoulême	1	Angouleme	3	Annecy	1
Aulnay sous Bois	2	Annecy	1	Arles	13
Cahors	5	Annonay	1	Avranches	1
Chalon sur Saône	20	Bayonne	1	Belley	1
Chartres	1	Belfort	2	Beziers	1
Chauny	1	Bordeaux	1	Bordeaux	2
Colmar	1	Bourgoin	1	Bourg En Bresse	3
Dijon	1	Briancon	3	Bourgoin	1
Giens	3	Cahors	10	Cahors	5
Gonesse	1	Chalon Sur Saone	8	Chartres	1
Hollande	1	Colmar	2	Colmar	15
Lisieux	1	Giens	46	Suresnes	2
Lyon hors HEH	9	Gonesse	1	Gap	1
Maison Lafitte	1	Grenoble	1	Giens	9
Mantes la Jolie	6	Laval	9	Gonesse	1
Mulhouse	3	Longjumeau	1	Grenoble	1
Orsay	2	Lyon Hors HEH	7	Hyeres	1
Paris	4	Mantes La Jolie	11	Lyon hors HEH	10
Perpignan	11	Montaigu	1	Maison Lafitte	1
St Germain en Laye	4	Mulhouse	1	Magny en vexin	1
Toulouse	4	Orsay	3	Metz	2
Voiron	4	Paris	1	Neuilly	2
		Poissy	1	Nice	1
		Privas	1	Orange	1
		Saint Pierre(Réunion)	1	Orsay	2
		St Germain En Laye	2	Poissy	1
		Suresnes	1	Privas	1
		Toulouse	2	Rangueil Toulouse	6
		Val De Grace	1	Selestat	2
		Vannes	3	St Germain en laye	2
		Villefranche/Saone	1	St Pierre De La Réunion	1
				Tahiti	3
				Val D'oise	1
				Vienne	1
				Villefranche / Saone	1
				Villefranche De Rouergue	3
				Voiron	3
				Thonon	1
				Thiers	1